

文章编号: 1004-7271(2008)06-0647-08

不同 pH 人工精浆对性逆转金鳟雄鱼 精子活力的影响

徐革锋¹, 李永发¹, 王炳谦¹, 贾钟贺¹, 陈玉春², 杜佳², 牟振波¹

(1. 中国水产科学研究院黑龙江水产研究所, 黑龙江 哈尔滨 150070;

2. 东北农业大学水产养殖系, 黑龙江 哈尔滨 150030)

摘要:研究了性逆转金鳟雄鱼(XX, 伪雄鱼)精子在不同 pH 的人工精浆(artificial seminal plasma, ASP)溶液中的活动情况。结果显示,随着 pH 的提高精子活力不断增强。伪雄鱼精子在不同 ASP-pHs 中培养 1 h 后, pH 9.5 ~ 10.5 培养组精子活力超过正常雄鱼精子(XY)活力水平,且正常雄鱼精子与 pH 8.5 ~ 9.5 培养组的精子活力不存在显著性差异($P > 0.05$)。将金鳟伪雄鱼精液培育在 pH 8.5 ~ 10.5 的 ASP 中,0 ~ 180 min 内, pH 10.5 中的精子寿命和激活比例都最佳,180 min 之后的精子寿命超过 80 s,激活比例在 90% 以上,显著好于其他 pH 组($P < 0.05$)。在低温储藏 12 h 后,正常雄鱼精子在 ASP-pH 10.5 溶液中寿命时间最长,为(284.05 ± 78.37) s,其次是同等稀释条件下的伪雄鱼精子寿命,其时间为(203.89 ± 43.68) s,正常雄鱼精液原浆精子寿命最短,为(122.19 ± 37.61) s。直接用金鳟伪雄鱼精液受精,发眼率和仔鱼上浮率仅为 12.50% 和 8.77%,而通过 pH 10.5 的 ASP 培养后,其发眼率和孵化率分别提高到了 52% 和 49.95%。因此,在高 pH 的 ASP 中培养金鳟伪雄鱼精子能提高其活力和延长寿命。通过这种处理也能够显著的提高金鳟全雌和全雌三倍不育后代的育苗生产效率。

关键词:金鳟;人工精浆;性逆转雄鱼;精子活力

中图分类号:S 917 **文献标识码:**A

Influence of different-pHs artificial seminal plasma on sperm motility of sex-reversed male golden rainbow trout

XU Ge-feng¹, LI Yong-fa¹, WANG Bing-qian¹, JIA Zhong-he¹,
CHEN Yu-chun², DU Jia², MOU Zhen-bo¹

(1. Heilongjiang River Fishery Research Institute, Chinese Academy of Fishery Science, Harbin 150070, China;

2. Department of Aquaculture, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

Abstract: The sperm motility of sex-reversed male golden rainbow trout (XX) in different pHs of artificial seminal plasma was studied. The result showed that the motility of sperm was uninterruptedly enhanced with the raise of pH. After being incubated in different pHs of artificial seminal plasma for 1 h, the sperm motility of sex-reversed male incubated in pH 9.5 - 10.5 of artificial seminal plasma exceeded that of normal male

收稿日期: 2008-03-30

基金项目: 黑水研基本科研专项(2007HSYZX-YY-21); 黑龙江省科技攻关项目(GC03B511; GA06B203-4); 科技部农转资金项目(2007GB23260395); 国家“十一五”支撑计划(2006BAD03B08); 公益性行业科研专项淡水重要经济鱼类产业化研究与示范(200803050)

作者简介: 徐革锋(1979-), 男, 黑龙江大庆人, 实习研究员, 主要从事鱼类育种方面的研究。E-mail: xgffish@yahoo.com.cn

通讯作者: 牟振波, E-mail: hfishmzb@hotmail.com

(XY), and there wasn't significant difference between the sperm motility of normal male and that of sex-reversed male incubated in pH 8.5 - 9.5 of artificial seminal plasma ($P > 0.05$). To incubate sperm of sex-reversed golden rainbow trout male in ASP-pHs (8.5 - 10.5), for 0 - 180 min, the sperm life and activation ratio of sperm in pH 10.5 of ASP were best, after 180 min, the sperm life exceeded 80 s, and the activation ratio of sperm was above 90%, which were significantly better than that incubated in other pH series ($P < 0.05$). After being stored 12 h at subambient temperature, the sperm life of normal male incubated in pH 10.5 of ASP was longest, which was (284.05 ± 78.37) s; next, the sperm longevity of sex-reversed male was (203.89 ± 43.68) s, and the sperm life of normal male was shortest that was (122.19 ± 37.61) s. The eyed ratio and flying up ratio of fertilizing by sperm of sex-reversed male golden rainbow trout were only 12.50% and 8.77%, respectively, but the eyed ratio and flying up ratio of fertilizing by sperm of sex-reversed male golden rainbow trout incubated in pH 10.5 of ASP were up to 52% and 49.95%. Thus, the incubation of the sex-reversed male golden rainbow trout sperm in high-pH artificial seminal plasma improved the motility and life of spermatozoa. By this treatment, it is possible to markedly increase production efficiency of raising seedling of all-female golden rainbow trout and all-female triploid sterile progenies.

Key words: golden rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*); artificial seminal plasma (ASP); sex reversal milter; sperm motility

金鳟 (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) 通体金黄色, 是虹鳟的一个体色分离种, 由日本和美国的科学家分别在虹鳟群体中选育出的体色变异品系, 属于引进品种。该鱼适应性强, 是常规冷水性养殖鱼类。其肉味鲜美, 营养丰富, 无肌间刺, 食用价值高, 除此之外, 还因其金黄体色而具有很高的观赏价值。引进后经过多年市场开发, 目前已成为继虹鳟之后我国养鳟业第二个重要商业养殖品种, 现苗种已被推广到吉林、辽宁、云南等 20 多个地区。近年来, 随着金鳟的热销, 带动了金鳟全雌三倍体的养殖, 且受到广大养殖户青睐, 因此, 批量生产全雌三倍体金鳟鱼卵成了当务之急。

众所周知, 大多数鲑科鱼类的性别判定机制都是 XY 型^[1-4], 即雌性个体的染色体型为 XX, 雄性的为 XY 型。因此, 只要使雌性配子 (XX) 与含有 X 染色体的雄性配子 (XY) 受精, 就能大量获得雌性后代。基于此目的, 通过雌核发育技术获得全雌二倍体稚鱼, 在其开始摄取外源性营养阶段通过给予雄性激素诱导获得性转换的雄鱼 (XY)。然而, 稚鱼在被雄性激素诱导期间, 激素浓度和水温不适当时, 精巢的发育会产生结构和功能的异常情况, 正常繁殖后代的培育水温不能低于 12℃^[5]。在较高的水温条件, 通过 17 α -甲基睾丸酮诱导的仔鱼虽然也会经历精子发生和精子形成过程, 但绝大部分精巢发育畸形。正常雌雄鱼交配, 需要通过人工获得自然成熟的鱼卵与由精巢精小叶流入经输精管排出体外的精液才能进行受精, 因为正常精子从精小叶流出必须经过输精管的高 pH 环境才能具有活力^[6]。而来自性逆转雄鱼精巢的精子不具备活动能力, 受精率极低。但为了使用性逆转雄鱼繁殖后代, 必须将其精巢精液经过高 pH 的人工精浆培养, 使其获得活力, 从而进行授精活动^[5]。在上述社会和研究背景下, 本试验通过不同 pH 的 ASP 来培养性逆转金鳟雄鱼精子, 提高精子活力, 之后通过多倍体诱导技术, 使这些功能性雄鱼为大量生产全雌和全雌三倍体鱼类做出遗传贡献。

1 材料与方法

1.1 亲本及试验鱼诱导

2004 年 3 月, 在黑龙江水产研究所渤海冷水性鱼试验站的美国品系金鳟可繁殖群体中挑选雌雄亲本各 5 尾, 其雌性个体平均体重为 (2.24 ± 0.13) kg, 平均叉长为 (46.50 ± 0.70) cm, 雄性个体平均体重为 (1.71 ± 0.076) kg, 平均叉长为 (40.32 ± 1.54) cm。

对上述亲本进行配子采集, 首先采集精液, 并进行精子灭活^[7], 然后采集卵子, 将失活精子与正常

二倍体卵子受精。采用热休克方法对受精卵进行处理^[8],之后孵化获得全雌金鳟二倍体仔鱼。同年 5 月,对上浮开口摄食仔鱼分组进行投喂混合有 17 α -甲基睾酮(USA Sigma)的饲料(1.5 mg/kg·饲料),诱导出一批性逆转雄鱼(XX,即伪雄鱼)^[8]。2006 年 3 月,经解剖发现伪雄鱼精巢发育成熟,其体重平均为(0.45 \pm 0.05) kg,平均叉长为(33.50 \pm 2.75) cm,通过机械破碎精巢收集其精液混合物;普通金鳟的精液是通过挤压成熟的雄鱼腹部获得,作为对照组。

1.2 试验处理

用于培养金鳟伪雄鱼精液和稀释正常金鳟精液(对照组)的 Artificial seminal plasma (ASP)^[8]—人工精浆,其 pH 值通过添加 1 mol/L NaOH 溶液进行调整,pH 检测仪校准,稀释比例 1:100(体积),培养温度 4 $^{\circ}$ C,到达培养时间点,用微量移液器吸取 50 μ L 的伪雄鱼精液培养液(或正常雄鱼精液混合液)放于玻璃载玻片上,经 0.10 mL Balanced salt solution (BSS)^[5]—生理盐水激活,并立即在显微镜下观察精子的活动情况。精子快速运动时间(精子活力)(fast movement time, FT)与寿命时间(life time, LT)的确定参见李胜忠等^[9]的研究标准,以 Toru 等^[5]的早期研究为基础并进行改进,将本试验分为三个处理:(1)研究金鳟伪雄鱼精液在何种 ASP-pH 培养条件,其精子活力能够达到(或超过)正常雄鱼精子活力水平,ASP 的 pH 梯度设为 7.5、8.5、9.5 和 10.5,培养时间设为 1 h。(2)研究不同培育时间对于金鳟伪雄鱼精液在 pH 为 8.5、9.5、10.5 的 ASP 中精子寿命和激活比例情况,培养时间设 15 min、45 min、90 min、120 min、150 min 和 180 min;之后进行长时间保存试验,将正常雄鱼精液,以及用 ASP-pH 10.5 溶液分别稀释的金鳟伪雄鱼精液和正常金鳟雄鱼精液各 1 mL,置于 4 $^{\circ}$ C 冰箱,12 h 后分别检查其精子寿命情况。(3)为了明确不同 pH 的 ASP 精液混合液对受精卵的发眼率和上浮率影响,将来自同一条伪雄鱼的精液分成两部分,一部分稀释后培养于 pH 为 8.5、9.5、10.5 的 ASP 中(处理组),另一部分不做任何处理(未处理组),保存于 4 $^{\circ}$ C、分别培养 1 h,之后分别与来自同一批的金鳟卵子授精,以正常金鳟二倍体受精卵做对照组,比较各组的发眼率和上浮率。

1.3 数据统计

所得数据通过统计软件 SPSS12.0 进行分析,主要采用单因素方差分析(ANOVA)和 Duncan 氏多重比较法进行统计,数值将以平均值 \pm 标准差(Mean \pm S. D)形式体现。

2 结果

本研究共活体取样 100 尾,在诱导的伪雄鱼中经解剖学和组织切片认定,诱导成功的伪雄鱼精巢两侧严重不对称,较大一侧呈鹅卵石状,且无输精管(图 1);组织学切片发现精小叶不规则(图 2),且呈卵巢结构分布,诱导(伪雄鱼)成功率为 60%。



图 1 金鳟伪雄鱼精巢
Fig. 1 Spermary of sex-reversed male golden rainbow trout

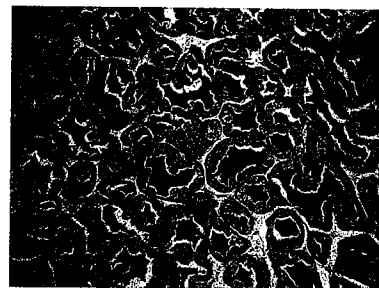


图 2 金鳟伪雄鱼精巢内精小叶及精子(箭头)
Fig. 2 Spermatozoon (arrowhead) and seminiferous lobule in spermary of sex-reversed male golden rainbow trout

2.1 ASP-pHs 激活伪雄鱼精子与普通雄鱼精子的活力比较

正常金鳟雄鱼精巢内成熟精子经过输精管排出后稀释于 BSS 中直接获得运动能力,其活力情况见

图3。金鳢伪雄鱼精巢精子发育完成后,将其稀释于BSS中不具备活力或活力极低(受精力低),但经过ASP-pHs培育(pH > 7.0)后可以用水或BSS激活,且具有很好的活力。ASP-pH 10.5培育的伪雄鱼精子具有最佳活力,平均为56.40 s,与其它各组精子活力存在显著性差异($P > 0.05$)(图3)。正常金鳢精子、pH 7.5、pH 8.5和pH 9.5组的活力分别为46.50 s、37.60 s、45.00 s和49.20 s,其各组精子快速运动时间无显著性差异($P > 0.05$)(图3)。

2.2 不同储存时间条件下伪雄鱼的精子寿命和激活比例

将金鳢伪雄鱼精液无论混入到哪个梯度pH的ASP溶液中,精子都无法立即(混合时间 < 1 min)被水或BSS激活。ASP-pH 7.5培养的伪雄鱼精子在180 min时间内寿命短,激活比例低(图4-A、D);ASP-pH 8.5培养的,在前90 min内精子寿命和激活比例都不理想,150 ~ 180 min其寿命和激活比例达到最佳(图4-B、E)。ASP-pH 10.5培养的在前45 min精子寿命和激活比例都一般,45 ~ 180 min

精子寿命和激活比例逐渐到达最佳(如图4-C、F)。在长时间低温储藏情况下,ASP-pH 10.5溶液中培育的正常雄鱼精子寿命与ASP-pH 10.5培育的伪雄鱼精子寿命和正常雄鱼精子寿命存在显著性差异($P < 0.05$),正常雄鱼精子在ASP-pH 10.5溶液中寿命最长,时间为(284.05 ± 78.37) s,其次是同等条件下的伪雄鱼精子寿命,其时间为(203.89 ± 43.68) s,正常雄鱼精子寿命最短,为(122.19 ± 37.61) s。

2.3 不同ASP-pH稀释液对于发眼率和上浮率的影响

利用不同ASP-pH培育的金鳢伪雄鱼精液受精,其受精卵的发育情况以及孵化参数见表1。各处理组受精卵死亡率较高,且发眼率和上浮率均显著低于对照组($P < 0.05$)(表1)。但经过pH 8.5 ~ pH 10.5 ASP培育的精液对受精率和发眼率的影响较大,且各ASP-pH组与未处理组均存在显著性差异($P < 0.05$)(表1)。

表1 不同ASP-pH稀释液对受精卵孵化的影响

Tab.1 The influence of the difference in pH of ASP diluent on hatching of fertilized ovum

| 参数 | 未处理 | pH 8.5 | pH 9.5 | pH 10.5 | 对照组 |
|---------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| 总卵量/mL | 250 | 250 | 250 | 250 | 250 |
| 发眼率/% | 12.50% ^a | 32.77% ^b | 36.90% ^b | 52.00% ^c | 64.20% ^d |
| 发眼期死亡/N | 1750 | 1209 | 1249 | 916 | 663 |
| 上浮率/% | 8.77% ^a | 31.00% ^b | 35.81% ^b | 49.95% ^b | 63.50% ^c |
| 畸形率/% | 0.49% | 0.49% | 1.56% | 0.98% | 0.42% |

注:同一行中不同上标表示差异显著($P < 0.05$)

3 讨论

3.1 伪雄鱼精子的激活机制

硬骨鱼类精子在其精巢、精液质和等渗的电解质溶液中一般不活动,即被制止,但有潜在运动能力,

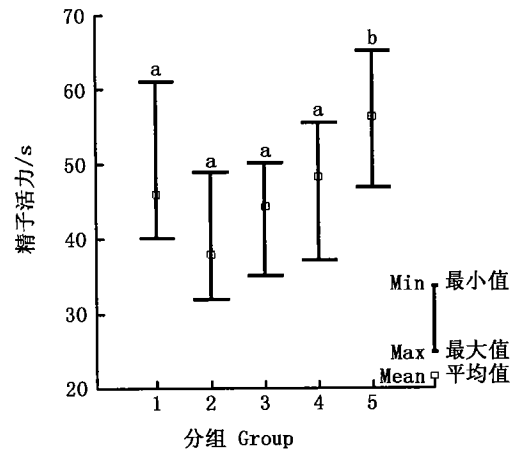


图3 ASP-pHs激活伪雄鱼精子与普通雄鱼精子的活力比较

Fig.3 Comparison of sperm motilities between sex-reversed male and normal male activated by ASP-pHs

注:1:正常金鳢精子活力;2-5分别为伪雄鱼精液培养在不同ASP-pH的活力变化。2: pH 7.5, 3: pH 8.5, 4: pH 9.5, 5: pH 10.5。高低图中的每个最高点上的相同字母表示不存在显著差异($P > 0.05$),反之存在差异($P < 0.05$)。

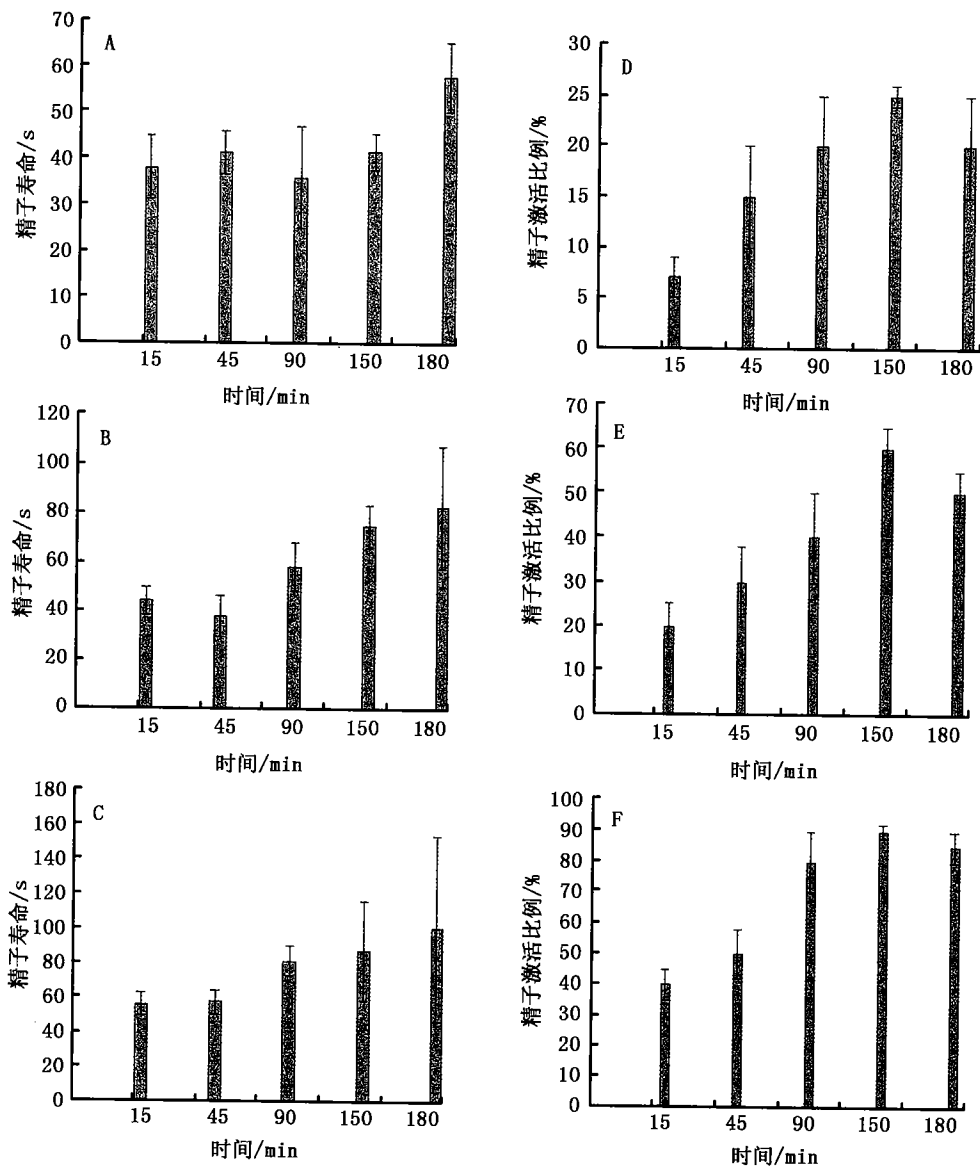


图 4 不同 pH 的 ASP 对伪雄鱼精子寿命和激活比例的影响

Fig. 4 Influence of the difference in pH of artificial seminal plasma on sperm life and activation ratio of sex-reversed male

注:A-C为精子寿命情况,D-F为激活精子比例的变化。Asp培养液的pH如下:A, D为pH 7.5; B, E为pH 8.5; C, F为pH 10.5。柱状图上的竖线表示平均值的标准差

只有当精子被排到体外并被体外环境的水或非等渗电解质溶液稀释后才能活动^[10-13],即激活, Morisawa等^[14]和 Bilandr等^[15]研究表明,不同鱼类的精子有不同的抑制与激活机制,而且精子受抑制或被激活与渗透压^[16-17]、离子^[18]和pH值^[19]等因素有关。一般淡水鱼类精液遇到低渗溶液或海水鱼精液遇到高渗溶液精子便开始运动^[20-21]。由于金鳟属于淡水鱼类,所以其精子遇到低渗溶液(水或BSS)即马上开始运动。有研究表明,如果将鲑鱼精液稀释到含K⁺低的溶液中,精子鞭毛立即运动,而反之则不运动^[22-23],但这种溶液对于伪雄鱼精液无效^[5]。Toru等^[5]认为,只有将性逆转雄鱼精液进行高pH溶液处理才能使其精子获得潜在动能,且不被激活。这与本研究所得到的结果一直,因为,正常二倍体精子在精巢内完成发生后,即通过输精管进行向鱼体外排出,其活力的潜能是在精小叶和输精管内获得,因为在输精管中的pH和HCO₃⁻浓度均明显较精小叶中高^[24]。Baynes等^[25]的研究认为,当

溶液 pH 值低于 7.5 时虹鳟精子运动受抑制,这与本研究获得的结果基本一致,因为伪雄鱼精巢精液 pH 低于 7.5,所以不经高 pH (>7.5) 溶液培育无法获得运动潜能。由于绝大多数虹鳟性逆转雄鱼精巢组织均由于药物诱导结构导致异常^[26-27],即金鳟伪雄鱼精巢同样无输精管,其精子无法获取高 pH 刺激,所以不具备活力潜能。本研究认为,金鳟伪雄鱼的精子激活机制与普通淡水鱼类精子激活机制基本一致^[28],只是由于人为干扰了伪雄鱼的正常发育,使其不具有激活精子运动潜能的 pH 环境,导致自然状态始终被抑制无法被激活,但当利用高 pH 溶液激活后,其精子活力与正常雄鱼精液的基本一致。

3.2 伪雄鱼精子活力的评价

鱼类精子活力是反映精子质量的重要指标,是研究精子生理特性、精子受精、精子保存等的基础,目前并没有一个统一标准。但一般通过显微镜观察精子运动的激烈程度、精子激活比例及精子运动时间等几方面来确定^[28]。因此,对伪雄鱼精子活力的评价也不例外,主要探讨 ASP-pHs 对于金鳟伪雄鱼精子活力、寿命时间、激活比例、受精率和发眼率的影响。

如果利用高浓度 K^+ 的 ASP 和高 pH 环境在一定时间内培养伪雄鱼精巢内精液,之后通过低浓度 K^+ 稀释液(BSS)激活,不但使其精子获得活力,还能延长其快速运动时间和寿命。在 pH 10.5 的 ASP 溶液中培养 1 h,伪雄鱼精子具有最佳活力,其快速运动时间为 56.40 s,低温 12 h 保存后,其寿命为 203.89 s,激活比例也高达 90% 以上,这与 Toru 等^[5]的研究结果相一致。阮国良等^[29]的研究表明,在 pH 仅为 7.6 时,泥鳅精子获得最佳活力,时间为 430 s,其寿命更长达 820 s,激活比例也达到最高 87%,这可能是温水性鱼类的特征。宽口光唇鱼在 pH 7.6 时获得最佳活力,但却在 pH 8.6 获得最大精子寿命^[30]。鲑鳟鱼的活力较其他温水性鱼类的差,这可能与种的差异有关,但这不影响该种类鱼的精子受精能力。

本研究认为高浓度 K^+ 的 ASP 以及高 pH 环境确实对金鳟伪雄鱼精液的活力起到积极的影响,不但能够提高其活力,还能延长其寿命和激活比例,从而达到提高受精率和受精卵发眼率的良好效果。本研究利用未经过任何处理的伪雄鱼精巢精液进行人工授精,其发眼率只有 12.50% (表 1)。但采用同一尾鱼精液稀释到 ASP-pH 10.5 溶液中培养后进行人工授精,其受精卵发眼率达到了 52%。这与 Toru 等^[5]的研究结果基本一致,只是他们获得的发眼率略高,但其试验设计较为简单,即对普通虹鳟直接进行投喂含有 17α -甲基睾酮的饲料,随即获得性逆转幼鱼,而后培育到性成熟并进行受精检测。而本研究处理相对更为复杂,不但进行了上述处理,还在之前对需要药物诱导的仔鱼进行了全雌处理,其中利用雌核发育技术和多倍体诱导技术进行全雌三倍体育种(待发表文章)。本研究的这种方法处理性逆转雄鱼可以在全雌后代中得到广泛应用,而且还可通过低温、高 pH 的 ASP 溶液保存精提高鱼苗育种的生产效率。

3.3 ASP-pHs 对于鲑鳟鱼遗传育种工作的意义

精子在经历精子管、小叶管和输精管的每个时期的成熟程度都不同,尤其是 pH 环境,随着不断成熟,其所需要的 pH 也越大。例如,有研究表明普通虹鳟精小叶中的 pH 低于输精管中(pH 7.8~8.0)^[11]。但 Rurangwa 等^[31]和 Wood 等^[32]的研究表明,工业化发展制造了许多废气,使空气中的二氧化碳和氮氧化物浓度逐年增高,周期性的频繁酸雨使水环境和滩涂酸化严重,个别区域的酸化环境已经影响到了该地区鱼类身体内环境的 pH,并使其体液渗透压发生了改变。其后果将影响精子在鱼体内的成熟,输精管内 pH 将更低,使得今后用于人工繁殖的雄鱼精子运动潜能退化,这将意味着用于繁殖的雄鱼种质退化。因此,本研究将对恢复精子的活动潜力以及提高其商业化制种效率有重大指导意义。本研究针对这种现象进行了深入研究,并证实给与金鳟精子高 pH 的 ASP 环境将提高其活力和寿命,不但对于伪雄鱼有效,而且对于恢复正常金鳟精子受精能力更为有效。但要注意缓冲液和 pH 的突然改变对精子所引起的损伤,这方面还有待进一步研究。应在适当范围内提高 ASP 溶液的 pH 值,用以培养金鳟伪雄鱼或正常金鳟雄鱼精子将显著提高其活力潜能和寿命。然而,有研究表明,除了提高 pH,还可以利用其他影响因素来提高精子运动潜能,如温度^[33]、 CO_2 ^[34]、葡萄糖和 forward-motility protein(FMP)^[35]等。如果能进一步分析上述影响因素,那么在常规育苗生长期有可能任意的控制精子活力强度及其寿命。尤

其对其他土著冷水性鲑鳟鱼的人工繁殖、育种和受精生物学研究等将起到重要的指导意义。

参考文献:

- [1] Luis O B, Jack L S, Michael G I, *et al.* Y-chromosomal DNA markers for discrimination of chemical substance and effluent effects on sexual differentiation in Salmon[J]. *Environmental Health Perspectives*, 2002, 110(9): 880 - 887.
- [2] Donaldson E M, Hunter G A. Sex control in fish with particular reference to salmonids[J]. *Can J Fish Aquat Sci*, 1982, 39: 99 - 110.
- [3] Yamazaki F. Sex control and manipulation in fish[J]. *Aquaculture*, 1983, 33: 329 - 354.
- [4] Devlin R H, Nagahama Y. Sex determination and sex differentiation in fish: An overview of genetic, physiological and environmental influences[J]. *Aquaculture*, 2002, 208: 191 - 364.
- [5] Toru K, Shozo F, Koichi U. Improvement of sperm motility of sex-reversed male rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, by incubation in high-pH artificial seminal plasma[J]. *Environmental Biology of Fishes*, 2004, 69: 419 - 425.
- [6] Morisawa S, Morisawa M. Acquisition of potential for sperm motility in rainbow trout and chum salmon[J]. *J Exp Biol*, 1986, 126: 89 - 96.
- [7] 徐连伟,贾忠贺,王炳谦. 利用紫外线辐射遗传失活精子诱导虹鳟雌核发育[J]. *水产学杂志*, 2006, 19(1): 14 - 18.
- [8] 王炳谦,徐连伟,贾钟贺,等. 热休克诱导全雌虹鳟三倍体[J]. *水产学杂志*, 2005, 18(2): 22 - 27.
- [9] 李胜忠,郭焱,蔡林钢,等. Na⁺、葡萄糖、果糖对凹目白鲑精子活力的影响[J]. *动物学杂志*, 2005, 40(4): 82 - 85.
- [10] Morisawa M. Initiation mechanism of sperm motility at spawning in teleosts[J]. *Zool Sci*, 1985, 2: 605 - 615.
- [11] Morisawa M. The process of initiation of sperm motility at spawning and ejaculation[M] Mohri H. (ed): *New Horizons in Sperm Cell Research*, Japan Science Society Press, Tokyo/Gordon and Breach Science Publishers New York, 1987: 137 - 157.
- [12] Billard R, Cosson M P. Some problems related to the assessment of sperm motility in freshwater fish[J]. *J Exp Zool*, 1992, 261: 122 - 131.
- [13] 邓岳松,林浩然. 鱼类精子活力研究进展[J]. *生命科学研究*, 1999, 3(4): 271 - 278.
- [14] Morisawa M, Morisawa S. Acquisition and initiation of sperm motility[C]//Gagnone C. *Controls of Sperm Motility Biological and Clinical Aspects*. CRC Pro Boca Raton FL, 1990, 137 - 151.
- [15] Bilardr R, Josso N, Criml M. Motility of fresh and aged halibut sperm[J]. *Aquat Living Resour*, 1993, 6: 67 - 75.
- [16] Marian T, Krasznai Z, Balkay L, *et al.* Hypoosmotic shock induces an osmolality-dependent permeabilization and structural changes in the membrane of carp sperm[J]. *J Histochem Cytochem*, 1993, 41: 291 - 297.
- [17] Tarai H, Morisawa M. Change in intracellular K⁺ concentration caused by external osmolality change regulates sperm motility of marine and freshwater teleosts[J]. *J Cell Sci*, 1995, 108: 1175 - 1181.
- [18] Billard R, Cosson P. Some problems related to the assessment of sperm motility in freshwater fish[J]. *J Exp Zool*, 1992, 261: 122 - 131.
- [19] Oda S, Morisawa R. Rises of intracellular Ca²⁺ and pH mediate the initiation of sperm motility by hyperosmolality in marine teleosts[J]. *Cell Motil Cytoskel*, 1993, 25: 171 - 178.
- [20] Lahnsteiner F, Berger B, Weismann T, *et al.* Motility of spermatozoa of *Alburnus alburnus* (Cyprinidae) and its relationship to seminal plasma composition and sperm metabolism[J]. *Fish Physiol Biochem*, 1996, 15: 167 - 179.
- [21] Lahnsteiner F, Patzner R A, Weismann T. Monosaccharids as energy resources during motility of spermatozoa in *Leuciscus cephalus* (Cyprinidae Teleostei)[J]. *Fish Physiol Biochem*, 1992, 10: 283 - 289.
- [22] Lahnsteiner F, Weismann T, Patzner R A. Evaluation of the semen quality of the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, by sperm motility, seminal plasma parameters, and spermatozoal metabolism[J]. *Aquaculture*, 1998, 163: 163 - 181.
- [23] Ohta H, Unuma T, Tshuji M, *et al.* Effects of bicarbonate ions and pH on acquisition and maintenance of potential for motility in ayu, *Plecoglossus altivelis* Temminck et Schlegel[J]. *Aquac Res*, 2001, 32: 385 - 392.
- [24] Miura T, Yamauchi K, Takahashi H, *et al.* The role of hormones in the acquisition of sperm motility in salmonid fish[J]. *J Exp Zool*, 1992, 261: 359 - 363.

- [25] Baynes S M, Scott A P, Dawson A P. Rainbow trout, *Salmo gairdnerii* Richardson, spermatozoa: effects of cations and pH on motility [J]. J Fish Biol, 1981, 19: 259 - 267.
- [26] Tsumura K, Blann V E, Lamony C A. Progeny test of masculinized female rainbow trout having functional gonoducts [J]. Prog Fish-Culturist, 1991, 53:45 - 47.
- [27] Piferrer F, Benfey T J, Donaldson E M. Gonadal morphology of normal and sex-reversed triploid and gynogenetic diploid coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) [J]. J Fish Biol, 1994, 45: 541 - 553.
- [28] 苏天凤, 艾红. 鱼类精子活力及其超低温保存研究综述 [J]. 上海水产大学学报, 2004, 13(4): 343 - 347.
- [29] 阮国良, 冯家斌, 杨代勤. 渗透压、pH 和温度对泥鳅精子活力及受精率的影响 [J]. 湖北农学院学报, 2004, 24(1): 22 - 25.
- [30] 陈晓耘. 不同 pH 值下宽口光唇鱼精子活力的变化 [J]. 西南民族学院学报(自然科学版), 2000, 26(1): 72 - 75.
- [31] Rurangwa E, Biegniowska A, Slominska E, et al. Effect of tributyltin on adenylate content and enzyme activities of teleost sperm: A biochemical approach to study the mechanisms of toxicant reduced spermatozoa motility [J]. Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol, 2002, 131: 335 - 344.
- [32] Wood C M, Wilson R W, Gonzalez R J, et al. Responses of an Amazonian teleost, the tambagui (*Colossoma macropomum*), to low pH in extremely soft water [J]. Physiol Zool, 1998, 71: 658 - 670.
- [33] 李加儿, 区又君, 江世贵. 环境因子变化对平鲷精子活力的影响 [J]. 动物学杂志, 1996, 31(3): 6 - 9.
- [34] Dreanno C, Cosson J, Andre F, et al. CO₂ effect on turbot (*Scophthalmus maximus*) spermatozoa motility [C] // Goetz F W, Thomas P. Proceedings of the fifth international symposium on the reproductive physiology of fish. Austin, TX: The University of Texas at Austin Printing Department, 1995, 114.
- [35] Lahnsteiner F, Berger B, Weismann T. Sperm metabolism of the teleost *Chalcalburnus chalcoides* and *Oncorhynchus mykiss* and its relation to motility and viability [J]. J Exp Zool, 1999, 284: 454 - 465.